

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 421—426, September 1971

Methodik der Gaschromatographie und Massenspektrometrie der „neueren Östrogene“

Von H. ADLERCREUTZ und T. LUUKKAINEN

Institut für Klinische Chemie der Universität Helsinki, Finnland

(Eingegangen am 19. Januar 1971)

Die Methodik der Gaschromatographie und Massenspektrometrie der „neueren Östrogene“ wird besprochen. Es werden einige Anmerkungen zur Hydrolyse, Extraktion und Vorfraktionierung gemacht. Die Hauptwege der Fragmentierung des Östrogenmoleküls bei der Massenspektrometrie werden angegeben und Resultate von Östrogenbestimmungen im Plasma und Urin von Schwangeren, im Nabelschnurplasma und in der Amnionflüssigkeit präsentiert.

Methods for the gas chromatography and mass spectrometry of "new oestrogens"

Methods for the gas chromatography and mass spectrometry of "new oestrogens" are reported. The hydrolysis, extraction and preliminary fractionation are discussed. The main pathways for the fragmentation of the oestrogen molecule in the mass spectrometer are given, and results for the determination of oestrogens in pregnancy plasma and urine, in umbilical plasma and in amniotic fluid are presented.

Gaschromatographie und kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie sind zwei Methoden, die das auf Östrogenstudien spezialisierte Hormonlaboratorium heutzutage kaum entbehren kann. Die außerordentliche Vielfältigkeit der vom Organismus hervorgerufenen Veränderungen des Östrogenmoleküls während der metabolischen Prozesse, die niedrige Konzentration und die Schwierigkeiten, die Metaboliten von chemisch ähnlichen Substanzen ohne Strukturveränderungen des Östrogenmoleküls zu trennen, fordern Methoden, die Empfindlichkeit, großes Trennungsvermögen und am Ende leicht kontrollierbare Spezifität auch auf den Stufen unter 100 ng besitzen. Eine Kombination eines sehr schonenden Extraktionsprozesses mit gaschromatographischer Trennung von Gruppen von Östrogenen und mit Identifizierung durch kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie erfüllt die obenerwähnten Forderungen. Damit man einen besseren Überblick über die Problematik der Östrogenbestimmungen bekommt, werden zuerst einige Bemerkungen über das Extraktionsverfahren gemacht und dann die Gaschromatographie und die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie separat diskutiert.

Hydrolyse, Extraktion und Vorfraktionierung

Da die Säurehydrolyse einige der „neueren Östrogene“ zerstört, ist dieses Verfahren für die meisten Östrogenkonjugate nicht verwendbar. Prolongierte, über 48 Stunden dauernde enzymatische Hydrolyse mit hohen Enzymkonzentrationen ist unserer Meinung nach nicht zu empfehlen (1), weil auch dabei Veränderungen des Östrogenmoleküls eintreten können (1, 2). Für die Hydrolyse der Östrogenkonjugate aus Galle, Blut, Urin und Fruchtwasser hat sich bisher eine Kombination von Gel-Filtration (3) und Enzymhydrolyse unter Verwendung von *Helix-pomatia*-Extrakt am besten bewährt (4—7).

Aus Urin ist ohne Gel-Filtration nach unseren Erfahrungen überhaupt keine quantitative Ausbeute zu bekommen (8, 9). Bei einem Vergleich dieses Verfahrens mit der Methode von COHEN (10), bei der eine Kombination von Ammoniumsulfat-Präzipitation und Enzymhydrolyse benutzt wird, fanden wir in Urinen mit niedrigen Östrogenwerten nach Gel-Filtration und Enzymhydrolyse für die drei klassischen Östrogene im Durchschnitt 80—200% höhere Werte.

Für die weitere Reinigung und Fraktionierung der Östrogene werden Lösungsmittelverteilung, Papierchromatographie und Adsorptions-Chromatographie an Aluminiumoxid verwendet (4, 5). Das Adsorbens (Aluminiumoxid sauer, Merck, Darmstadt) muß zuvor mit Äthylacetat gewaschen und danach reaktiviert und standardisiert werden (7). Ohne dieses Verfahren werden die empfindlicheren Östrogene von den neueren Aluminiumoxid-Chargen weitgehend zerstört, ein Phänomen, das bei den älteren Aluminiumoxid-Chargen nicht zu beobachten war.

Die ketonischen werden von den nichtketonischen Östrogenen mit der Girardtrennung (11) separiert. Anschließend können Östron und 2-Methoxyöstron (Fraktion 1) von den polaren ketonischen Östrogenen (Fraktion 2) durch Lösungsmittelverteilung getrennt werden. Beide Fraktionen werden an Aluminiumoxid gereinigt. Die weitere Reinigung der polaren ketonischen Östrogene erfolgt anschließend durch zwei aufeinander folgende Papierchromatographien (12). Danach sind beide ketonische Fraktionen bereit für die Gaschromatographie.

Von der nichtketonischen Fraktion werden eine polare (Fraktion 4 und 5) und eine nichtpolare Fraktion (Fraktion 3) mittels Lösungsmittelverteilung getrennt (4, 5, 13). Die nichtpolare Fraktion enthält eine Reihe von Östradiolen, die zuerst methyliert und dann an Aluminiumoxid chromatographiert werden. Danach ist auch diese Fraktion rein genug für die Gaschromatographie.

Da in der polaren, nicht ketonischen Fraktion die Konzentration von Östriol immer sehr viel höher als die der anderen epimeren Östriole ist, kann eine gute gaschromatographische Trennung erst nach Trennung der cis-glykolischen Östriole (Fraktion 4) von den trans-glykolischen Östriolen (Fraktion 5) durch Acetonidbildung erzielt werden. Die Acetonide von 16-Epiöstriol und 17-Epiöstriol haben gute gaschromatographische Eigenschaften (14). Da sie sehr stabil sind, können sie gut an Aluminiumoxidsäulen vorgereinigt werden (4, 5). Auf diese Weise können auch niedrige Konzentrationen von 17-Epiöstriol gemessen werden.

Als Endergebnis dieser Vorfraktionierung werden folgende für die Gaschromatographie geeignete Fraktionen erhalten (4, 5):

Fraktion 1 (unpolare ketonische Fraktion): Östron und 2-Methoxyöstron.

Fraktion 2 (polare ketonische Fraktion): 16 α -Hydroxyöstron, 16 β -Hydroxyöstron, 16-Oxo-Östradiol und 15 α -Hydroxyöstron.

Fraktion 3 (unpolare nicht ketonische Fraktion): 11-Dehydro-Östradiol-17 α , Östradiol-17 α , Östradiol-17 β und 2–3 unbekannte Östradiole.

Fraktion 4 (cis-Glykole): 17-Epiöstriol und 16-Epiöstriol.

Fraktion 5 (trans-Glykole): Östriol sowie andere Östrogene, die noch nicht bestimmt werden können.

Gaschromatographie

Gaschromatographie ohne Derivatbildung ist nur für diejenigen Östrogene möglich, die außer der phenolischen Hydroxylgruppe noch ein oder zwei Oxogruppen oder eine weitere Hydroxylgruppe enthalten. Mehrere Östrogene zerfallen bei hohen Temperaturen. Phenolische Steroide mit vielen funktionellen Gruppen werden irreversibel am Säulenmaterial adsorbiert.

Zu den ersten Derivaten, die für die Gaschromatographie von Östrogenen verwendet wurden, gehören die sehr stabilen Acetate (15). Jedoch werden einige Polyhydroxyöstrogene nicht quantitativ acetyliert. Darüber hinaus können kleine Mengen von Diacetat mit der Bestimmung einiger anderer in kleinen Mengen vorkommender Östrogene interferieren. Die Gaschromatographie von Submikrogrammengen von Östrogenacetaten erfordert hohe Säulentemperaturen und die Vorbehandlung der Säulen mit großen Mengen von Steroidacetat. Die Reaktion des Detektors auf Polyhydroxyöstrogenacetate ist infolge der langen Retentionszeiten bei gleichzeitiger Adsorption an der Säule gering (16).

Trifluoroacetate als Derivate von Östrogenen (17) haben, obgleich sie leicht dargestellt werden können, nicht viel Verwendung gefunden. Die Heptafluorobutyrate derivate phenolischer Steroide können mit Elektroneneinfang-Detektoren analysiert werden (18). Die große Empfindlichkeit der Elektroneneinfang-Detektoren erfordert jedoch sehr reine Extrakte; deshalb haben diese Methoden keine größere Verwendung gefunden.

Die für die Gaschromatographie von Östrogenen am besten geeigneten Derivate sind ohne Zweifel die Trimethylsilylätherderivate (19): Oft können Doppel-derivate von Vorteil sein, wie z. B. Trimethylsilylätherderivate von Östrogenmethyläthern (20) oder von Acetoniden (14). Für sehr empfindliche Methoden mit Elektroneneinfang-Detektoren können die Monochlor- oder die Monobromtrimethylsilylätherderivate benutzt werden (21).

Die Trimethylsilyläther von Östrogenen können auf verschiedene Weise hergestellt werden (19, 22, 23). Alle Methoden ergeben gleiche Resultate, vorausgesetzt, die Analysenproben werden vor Säure und Wasser geschützt. Der Trenneffekt dieser Methode ist dem der meisten anderen Derivat-Methoden überlegen, so daß auch die epimeren Östrogene leicht voneinander getrennt werden können. Jedoch sind auch hier wegen der großen Zahl verschiedener Östrogenmetaboliten die beschriebenen Vorfraktionierungen vor der Gaschromatographie unerlässlich.

Ein großer Vorteil der Trimethylsilylätherderivate ist ihre monatelange Haltbarkeit. Die Derivate können wieder hydrolysiert werden, so daß die freien Steroide für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. In den Abbildungen 1–3 sind einige Gaschromatogramme von Trimethylsilylätherderivaten verschiedener phenolischer Steroide dargestellt. Die gaschromatographischen Gipfel sind scharf und symmetrisch. Abbildung 1 zeigt die gaschromatographische Trennung der unpolaren ketonischen (Fraktion 1) und der polaren ketonischen Fraktion (Fraktion 2) aus Schwangerenurin. In Abbil-

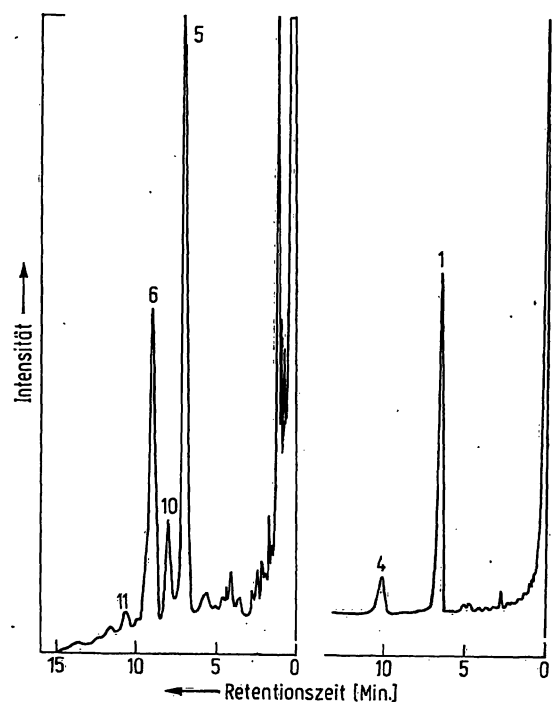


Abb. 1
Gaschromatographische Trennung der Trimethylsilyläther von Östrogenen im Schwangerenurin mit der Methode von ADLERCREUTZ und LUUKKAINEN (4, 5) (1,5% QF-1; 221°). — Rechts Fraktion 1 (unpolare ketonische Fraktion): Östron (1), 2-Methoxyöstron (4). — Links Fraktion 2 (polare ketonische Fraktion): 16 α -Hydroxyöstron (5), 16 β -Hydroxyöstron (10), 16-Oxo-Östradiol-17 β (6), 15 α -Hydroxyöstron (11).

dung 2 ist ein Beispiel für die Gaschromatographie von Doppelderivaten phenolischer Steroide aus Schwangerenurin dargestellt. Die Östrogene der unpolaren nicht-ketonischen Fraktion (Fraktion 3) wurden als Trimethylsilyläther von 3-Methoxy-Verbindungen, die cis-Glykole (Fraktion 4) als Trimethylsilyläther von Acetoniden gaschromatographiert. Diese Methode ist auch gut für Schwangerenplasma zu verwenden. Abbildung 3 gibt ein Beispiel für die Trennung der Trimethylsilyläther von Fraktion 2 (polare ketonische Fraktion) aus Plasma, das am Termin entnommen wurde.

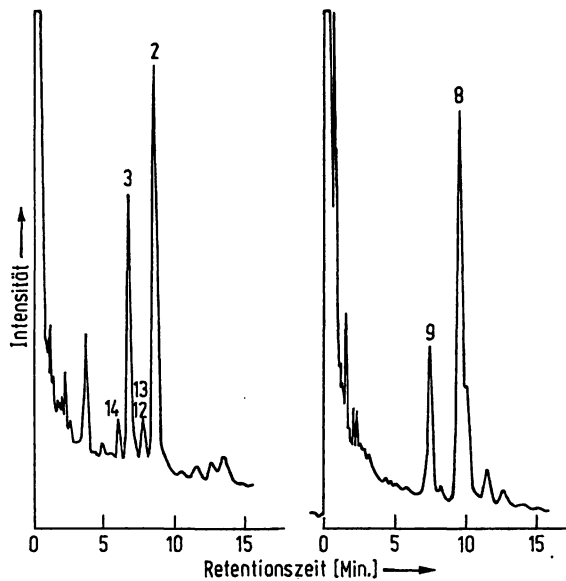


Abb. 2

Gaschromatographische Trennung der Doppelderivate von Östrogenen im Schwangerenurin mit der Methode von ADLERCREUTZ und LUUKKAINEN (4, 5) (1% SE-30; 230°). — Links Fraktion 3 (unpolare nicht-ketonische Fraktion; Trimethylsilyläther von Östrogen-Methyläthern): Östradiol-17 β (2), Östradiol-17 α (12), zwei unbekannte Östradiole mit zusätzlicher Doppelbindung (13, 14), 11-Dehydro-Östradiol-17 α (3). — Rechts Fraktion 4 (cis-Glykole; Trimethylsilyläther von Östrogen-Acetoniden): 16-Epiöstriol (8), 17-Epiöstriol (9). — Der Gipfel von 16-Epiöstriol enthält eine Verunreinigung, die gelegentlich in dieser Fraktion auftritt

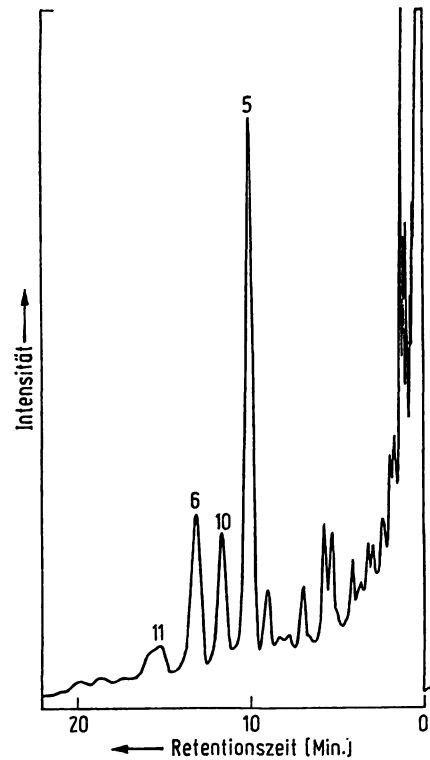


Abb. 3

Gaschromatographische Trennung der Trimethylsilyläther von Östrogenen in Schwangerenplasma (bei der Geburt entnommen) mit der Methode von ADLERCREUTZ und LUUKKAINEN (4, 5) (1% QF-1; 212°). — Fraktion 2 (polare ketonische Fraktion): 16 α -Hydroxyöstron (5), 16 β -Hydroxyöstron (10), 16-Oxo-Östradiol-17 β (6), 15 α -Hydroxyöstron (11). — Nach ADLERCREUTZ, IKONEN und LUUKKAINEN (unveröffentlicht)

Tab. 1

Bestimmung von Östrogenen im Urin bei normalen und pathologischen Schwangerschaften. Methode nach ADLERCREUTZ und LUUKKAINEN (5). 15 α -Hydroxyöstriol wurde nach HEIKKILÄ und Mitarbeitern (31) bestimmt. Alle Werte sind in $\mu\text{g}/24$ Stunden ausgedrückt

Diagnose	Schwangerschaftsmonat	Östriol	Östron	2-Methoxyöstron	Östradiol-17 β	Östradiol-17 α + unbekannte Östradiole	11-Dehydro-Östradiol-17 α	16 α -Hydroxyöstron	16 β -Hydroxyöstron	16-Oxo-Östradiol	16-Epiöstriol	17-Epiöstriol	15 α -Hydroxyöstron	15 α -Hydroxyöstriol
A. M. normal	VIII	19200	163	5	124	15	60	298	280	590	584	+	288	948
A. M. normal	IX	32000	605	—	162	16	82	360	nicht bestimmt	261	1380	66	nicht bestimmt	792
A. M. normal	IX	34200	441	—	131	17	89	694	336	712	1170	86	251	2070
A. M. normal	X	38800	460	—	160	25	113	657	224	877	1690	90	254	1190
S.-M. M. normal	VII	6000	1130	82	164	5	13	188	195	503	250	+	75	nicht bestimmt
S.-M. M. normal	IX	13300	1250	56	189	19	14	903	106	1700	468	54	51	nicht bestimmt
G. J. normal	VIII	10300	1690	132	126	6	39	2950	165	1550	158	+	202	nicht bestimmt
H. H. Zwillings-schwangerschaft	X	93300	1730	85	436	114	317	4380	1620	4480	2940	305	893	nicht bestimmt
G. K. Intrahepatische Cholestase	VIII	16800	401	103	80	18	76	6360	598	2130	232	+	153	nicht bestimmt
M. E. Intrahepatische Cholestase	VIII	13300	388	85	84	18	46	2090	220	917	197	+	115	nicht bestimmt

Tab. 2

Resultate von Östrogenbestimmungen in 5 Sammelplasmen von normalen Schwangeren am Termin, in 7 Proben von Nabelschnurplasma und 7 Proben von Amnionflüssigkeit. Die Werte sind Mittelwerte ($\pm s$) und sind in $\mu\text{g/Liter}$ ausgedrückt und für methodische Verluste korrigiert. Ein Pluszeichen bedeutet, das Steroid wurde durch Massenspektrometrie qualitativ nachgewiesen, aber nicht quantitativ bestimmt. Ein Minus-Zeichen bedeutet, das Steroid war nicht nachweisbar

Östrogen	Schwangerenplasma		Nabelschnurplasma		Amnionflüssigkeit	
	frei	konjugiert	frei	konjugiert	frei	konjugiert
Östriol	6.1 \pm 2.8	124 \pm 17	140 \pm 41	1030 \pm 640	56 \pm 52	931 \pm 477
Östron	9.9 \pm 2.6	80 \pm 6	26 \pm 7	28 \pm 8	5.6 \pm 5.0	8.0 \pm 3.9
2-Methoxyöstron	1.5 \pm 1.4	1.3 \pm 1.3	1.2 \pm 0.8	1.8 \pm 1.5	+	+
Östradiol-17 β	15 \pm 6	4.5 \pm 1.2	7.3 \pm 5.8	3.4 \pm 1.2	+	1.2 \pm 1.2
Östradiol-17 α + unbekannte Östradiole	—	0.5 \pm 0.5	—	+	—	—
11-Dehydroöstradiol-17 α	—	3.5 \pm 2.8	—	2.5 \pm 2.3	—	1.6 \pm 1.5
16 α -Hydroxyöstron	2.1 \pm 2.2	40 \pm 17	3.6 \pm 1.4	46 \pm 16	2.2 \pm 1.5	25 \pm 14
16 β -Hydroxyöstron	—	4.3 \pm 3.2	1.1 \pm 1.1	12 \pm 6	—	21 \pm 12
16-Oxo-Östradiol	2.3 \pm 1.9	20 \pm 7	5.9 \pm 4.5	79 \pm 67	2.9 \pm 3.4	27 \pm 12
16-Epiöstriol	1.1 \pm 1.0	5.4 \pm 3.9	1.7 \pm 1.1	6.5 \pm 6.0	—	5.7 \pm 5.1
17-Epiöstriol	—	—	+	0.8 \pm 0.8	+	1.6 \pm 1.5
15 α -Hydroxyöstron	+	2.1 \pm 2.0	0.6 \pm 1.0	4.4 \pm 3.0	0.8 \pm 0.9	3.9 \pm 3.2

auch normale Fälle mit vergleichbarem Gestationsstadium in mehreren Fraktionen bemerkenswert unterschiedliche Ausscheidungsraten aufweisen können. In Tabelle 2 sind die Bestimmungen von 12 Östrogen-Fraktionen aus Sammelplasma von Schwangeren am Termin enthalten. Ein Vergleich der freien und konjugierten Anteile dieser Fraktionen zeigt, daß im Plasma nur Östradiol-17 β überwiegend als freies Steroid vorliegt. Bestimmungen von 12 Östrogen-Fraktionen im Fruchtwasser und Nabelschnurplasma sind auch in Tabelle 2 gegeben. Beim Vergleich mit den Werten im Schwangerenplasma fällt auf, daß Östriol im Fruchtwasser und Nabelschnurplasma in etwa 7–10fach höherer Konzentration vorliegt als im Schwangerenplasma. Auch 15 α -Hydroxyöstron hat im Fruchtwasser und Nabelschnurplasma eine höhere Konzentration. Dagegen sind die Konzentrationen von Östron, Östradiol-17 β und 2-Methoxyöstron im Schwangerenplasma z. T. mehr als eine Größenordnung höher als im Fruchtwasser. Vergleicht man Fruchtwasser und Urin, so liegen die Urinwerte für Östron, 2-Methoxyöstron und 16-Epiöstriol bis zu über dreihundertfach höher. Die Östriol-Konzentration liegt dagegen im Urin nur etwa 30–40fach über der Konzentration im Fruchtwasser und Nabelschnurplasma.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie haben wir das LKB 9000 Gaschromatograph-Massenspektrometer benutzt. Dieses Instrument ist nicht nur für qualitative Untersuchungen, d. h. für Bestimmungen der Spezifität, sondern auch für quantitative Bestimmungen zu verwenden. Enthält ein gaschromatographischer „peak“ zwei verschiedene Östrogene mit verschiedenem Molekulargewicht, so können die Mengen beider Komponenten mit Hilfe eines Massenspektrometers durch Aufnahme mehrerer Massenspektren der genannten gaschromatographischen Kurve gemessen werden. Die hohe Empfindlichkeit des Massenspektrometers ermöglicht die quantitative Bestimmung sehr kleiner Steroidmengen. So konnten wir z. B. Pregnandiol in einer Menge von 4 pg/Probe quantitativ

bestimmen. Dabei wurde von uns die Konzentration eines Fragments (m/e 117) während der Elution des Steroids aus der gaschromatographischen Säule gemessen. Für Östrogene haben wir diese Technik noch nicht verwendet.

Für qualitative Untersuchungen sind die Trimethylsilyl-ätherderivate am besten geeignet, da sie eine sehr typische Fragmentierung aufweisen und verhältnismäßig stabil sind. Auch Doppelderivate mit Methyl-, Methoxim- oder Acetonidgruppen sind sehr stabil und eignen sich für qualitative Untersuchungen besonders deshalb, weil sie mehr Information über die Struktur der untersuchten Östrogene geben können. Alle Fragmente, die den Ring A enthalten, können sehr leicht lokalisiert werden, wenn zuerst ein Massenspektrum des Trimethylsilyläthers und anschließend des Trimethylsilyläthers der methylierten Substanz aufgenommen wird. Die den Ring A enthaltenden Fragmente der Doppelderivate sind jetzt um 58 Masseneinheiten kleiner als die Fragmente des einfachen Trimethylsilyläthers.

Der Nachweis von ketonischen Gruppen in unbekannten Östrogenmolekülen ist mit zwei Methoden möglich: Zuerst kann man die Oxogruppen mit Borhydrid reduzieren und danach die entstandenen Hydroxylgruppen in Trimethylsilyläther verwandeln. Dann beobachtet man im Massenspektrogramm für jede Oxogruppe eine Zunahme des Molekulargewichtes um 74 Masseneinheiten. Eine zweite Methode ist die Umwandlung der Oxogruppen in Methoximderivate; (24), dabei wird das Molekulargewicht für jede Oxogruppe um 29 Masseneinheiten größer.

Nach der Charakterisierung der Substanz durch Molekulargewichtsbestimmungen und vor und nach verschiedenen Derivatbildungen muß die massenspektrometrische Fragmentierung interpretiert werden. Die Fragmentierung der Östrogene ist sehr typisch und wurde zuerst für Monohydroxy-, Monoketo- und Dihydroxyöstrogene von DJERASSI und Mitarbeitern (25) beschrieben. Die Ursache dieser charakteristischen Fragmentierung ist die spezielle Struktur der Östrogene. Die phenolische Hydroxylgruppe ist sehr reaktiv und kann sehr stabil mit einer Methyl- oder Trimethylsilylgruppe

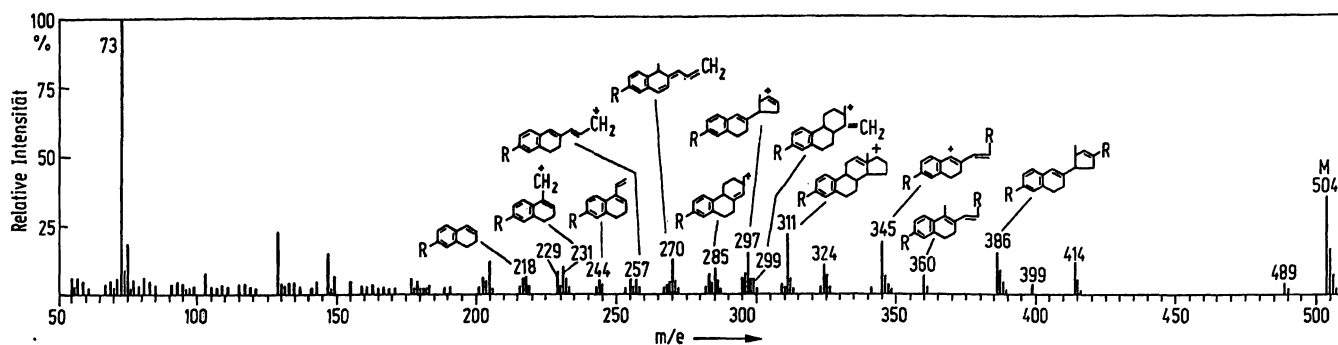


Abb. 4
Massenspektrum von Östriol-Trimethylsilyläther (70 eV) mit Angabe einiger charakteristischer Fragmente

markiert werden. Der Ring A der Östrogene stabilisiert auch den Ring B; deshalb entsteht im Massenspektrum von Östrogen-trimethylsilyläthern ein typisches Fragment bei m/e 218 (Abb. 4). Enthält der Ring B eine Hydroxylgruppe, so findet man dieses Fragment bei m/e 216, da in Ring B durch Eliminierung der Hydroxylgruppe eine Doppelbindung mit Trimethylsilylätherradikal (M-90) entstanden ist. Die Trimethylsilyläthergruppe der phenolischen Hydroxylgruppe ergibt nicht M-90. Bei den 2-Hydroxyöstrogenen verlieren die Ringe A und B ihre Stabilität, und bei den 2-Methoxyöstrogenen sieht man das entsprechende Fragment bei m/e 248. Auch bei diesen Östrogenen ist die Stabilität der Ringe A und B schlechter als bei Östrogenen, die nur eine Hydroxylgruppe in Ring A besitzen. M-90 ist ein charakteristisches Fragment bei Ditrithylsilylätherderivaten von Östradiolen, besitzt jedoch keine quantitative Bedeutung bei Ring D α -ketolischen Östrogenen. Bei Trimethylsilylätherderivaten von Östrogen-Triolen werden stets Fragmente bei M-90 und M-180 gefunden.

Östrogene verlieren durch den Verlust von C_{11} und C_{12} leicht 28 Masseneinheiten (26, 27). Nach DJERASSI und Mitarbeitern (25) beruht dieser Verlust auf der Eliminierung von C_6 und C_7 .

Einige typische Fragmente, die durch den Verlust von 28 Masseneinheiten entstehen, sind in Tabelle 3 dargestellt.

Alle charakteristischen Fragmente, die DJERASSI und Mitarbeiter (25) für Methylätherderivate der Östrogene

gefunden haben, treten auch bei Trimethylsilylätherderivaten auf. Diese Fragmente sind: A + B + C Ring = 285, A + B Ring + ($C_{13}-C_{15}$) = 257, A + B Ring + ($C_{11}-C_{12}$) = 244 und A + B Ring + C_{11} = 231.

Trimethylsilyl-Derivate von Ring D α -ketolischen Östrogenen mit einer 16 α -Hydroxyl- und einer 17-Oxogruppe ergeben typische Fragmente bei m/e 342 (M-88) und m/e 323 (M-(90 + 15 + 2)). Der Verlust von Ring D ergibt ein Fragment bei m/e 286, und nicht, wie bei den übrigen Östrogenen, bei m/e 285 (4). Das entsprechende 16 β -Hydroxysteroid gibt eine ähnliche Fragmentierung; die Substanz kann jedoch nach Reduktion der 17-Oxo-Gruppe mit Borhydrid und Bildung des 16 β ,17 β -Acetonids identifiziert werden.

Das den obengenannten Östrogenen isomere 16-Oxo-Östradiol-17 β ergibt als Trimethylsilyl-Derivat charakteristische Fragmente bei m/e 258 und 245, und nicht, wie die Ring D α -ketolischen Östrogene, bei m/e 257 und 244 (4). Außerdem ergibt das Trimethylsilyl-Derivat von 16-Oxo-Östradiol-17 β zwei weitere typische Fragmente im niedrigeren Massenbereich bei m/e 129 und 143. Diese Fragmente werden auch im Massenspektrum von 16-Oxo-5-Androsten-3 β , 17 β -diol (7) gefunden.

Bei der massenspektrometrischen Analyse von Östrogen-Acetoniden findet man typische Fragmente bei m/e M-15, M-58, M-75 und M-101 (28). Diese Fragmentierung ist prinzipiell ähnlich mit O-Isopropylidenderivaten von Monosacchariden (29).

Die Fragmentierung der epimeren Östriole, die nicht durch Derivatbildung separiert werden können, ist von der Ionisationsenergie abhängig, die 16 eV für die 6 α - und 6 β -Hydroxyöstradiole und 13 eV für Östriol und 16, 17-Epiöstriol betragen sollte (28). Dadurch ist es möglich, verschiedene Fragmentierungen zu erzielen und die genannten Epimeren durch verschiedene Massenspektren zu identifizieren. Östradiol-17 β und Östradiol-17 α produzieren auch bei niedriger Ionisationsenergie gleiche Massenspektren. Gaschromatographisch werden sie doch sehr gut separiert. Bei 15 α -Hydroxyöstriol bilden die Trimethylsilyl-Gruppen am 15 α - und 16 α -Hydroxyl ein sehr typisches Fragment bei m/e 191, das, ebenso wie bei neutralen Steroiden, die beiden Trimethylsilyl-Gruppen enthält (30).

Abschließend ist festzustellen, daß die Massenspektrometrie allein die Struktur eines Östrogens nicht definitiv

Tab. 3

Einige typische massenspektrometrische Östrogenfragmente, die durch Verlust von 28 Masseneinheiten (ohne oder zusammen mit anderen Teilen des Moleküls) entstanden sind

		m/e
Östron	M — 28	= 314
Östradiol	M — (90 + 28)	= 298
Östriol	M — (90 + 28)	= 386
und	M — (89 + 90 + 28)	= 297
6-Hydroxyöstradiol	M — (90 + 89 + 2 + 28)	= 295
2-Methoxyöstron	M — (2 + 28)	= 342
16 α -Hydroxyöstron	M — 28	= 402
und	M — (90 + 28)	= 312
16-Oxo-Östradiol	M — 28	= 402
und	M — (15 + 28)	= 387
und	M — (90 + 28)	= 312
und	M — (90 + 28 + 15)	= 297

klären kann. Man kann jedoch, vorausgesetzt es sind authentische Referenzsubstanzen erhältlich, die Struktur unbekannter Östrogene durch die Kombination von Gaschromatographie und Massenspektrometrie immer

bestimmen. Sind keine Standardsubstanzen erhältlich, so kann die Struktur weitgehend charakterisiert, aber nicht immer definitiv geklärt werden.

Literatur

1. ADLERCREUTZ, H., *Acta endocr., K'hvn. Suppl.* 72 (1962). —
2. SLAUNWHITE, W. R., JR. und A. A. SANDBERG, *Endocrinology* 67, 815 (1960). — 3. BELING, C. G., *Acta endocr., K'hvn. Suppl.* 79 (1963). — 4. ADLERCREUTZ, H. und T. LUUKKAINEN, *Acta endocr., K'hvn. Suppl.* 124, 101 (1967). — 5. ADLERCREUTZ, H. und T. LUUKKAINEN, in: *Gas Chromatography of Hormonal Steroids*, Scholler, R. & Jayle, M. F., eds., Dunod, Paris, Gordon and Breach, New York (1968). — 6. ADLERCREUTZ, H., M. IKONEN und T. LUUKKAINEN, in: *7th International Congress of Clinical Chemistry, Vol. 3. Hormones, Lipids and Miscellaneous*, Karger, Basel, München, Paris, New York (1970). — 7. SIEGEL, A. L., H. ADLERCREUTZ und T. LUUKKAINEN, *Ann. med. exper. biol. Fenniae* 47, 22 (1969). — 8. ADLERCREUTZ, H., *Acta endocr., K'hvn* 57, 49 (1968). — 9. ADLERCREUTZ, H. und T. LUUKKAINEN, in: *Gas Phase Chromatography of Steroids*, Eik-Nes K. & Horning, E. C., eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968). — 10. COHEN, S. L., *J. Clin. Endocr.*, Springfield, 26, 994 (1966). — 11. GIVNER, M. L., W. S. BAULD und K. VAGI, *Biochem. J.* 77, 400 (1960). — 12. BREUER, H., in: *Research on Steroids*, Cassano C., ed., Poliglotta, Vaticana 1, 133 (1963). — 13. BROWN, J. B., *Biochem. J.* 60, 185 (1955). — 14. ADLERCREUTZ, H., S. LAIHO und T. LUUKKAINEN, in: *Gas Chromatographic Determination of Hormonal Steroids*, Polvani, F., Surace, M. & Luisi, M., eds., Academic Press, New York, London (1967). — 15. WOTIZ, H. H. und H. F. MARTIN, *J. biol. Chemistry* 236, 1312 (1961). — 16. KNUPPEN, R. und H. BREUER, in: *Gas Chromatography of Hormonal Steroids*, Scholler, R. & Jayle, M. F., eds., Dunod, Paris, Gordon and Breach, New York (1968). — 17. VANDEN HEUVEL, W. J. A., J. SJÖVALL und E. C. HORNING, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 48, 596 (1961). — 18. WOTIZ, H. H., G. CHARRANSOL und I. N. SMITH, in: *Gas Chromatographic Determination of Hormonal Steroids*, Polvani, F., Surace, M. & Luisi, M., eds., Academic Press, New York, London (1967). — 19. LUUKKAINEN, T., W. J. A. VANDEN HEUVEL, E. O. A. HAAHTI und E. C. HORNING, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 52, 599 (1961). — 20. LUUKKAINEN, T. und H. ADLERCREUTZ, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 70, 700 (1963). — 21. THOMAS, B. S., C. EABORN und D. R. M. WALTON, *Chem. Commun.* 13, 408 (1966). — 22. GRUNDY, S. M., E. H. AHRENS und T. A. MIETTINEN, *J. Lipid Res.* 6, 397 (1965). — 23. STALLING, D. L., G. W. GEHRKE und R. W. ZUMWALT, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 616 (1968). — 24. FALES, H. M. und LUUKKAINEN, *Analytic. Chem.* 37, 955 (1965). — 25. DJERASSI, C., J. M. WILSON, H. BUDZIKIEWICZ und J. W. CHAMBERLAIN, *J. Amer. chem. Soc.* 84, 4544 (1962). — 26. LUUKKAINEN, T. und H. ADLERCREUTZ, *Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)* 107, 579 (1965). — 27. LUUKKAINEN, T. und H. ADLERCREUTZ, *Ann. Med. exp. Fenn.* 45, 264 (1967). — 28. ADLERCREUTZ, H. und T. LUUKKAINEN, in: *Gas Chromatography of Hormonal Steroids*, Scholler, R. & Jayle, M. F., eds., Dunod, Paris, Gordon and Breach, New York (1968). — 29. DE JONGH, D. C. und K. J. BIEMANN, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 67 (1964). — 30. GUSTAFSSON, J. Å. und J. SJÖVALL, *Europ. J. Biochem.* 6, 227 (1968). — 31. HEIKKILÄ, J., H. ADLERCREUTZ und T. LUUKKAINEN, *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 21 (1968) Suppl. 101, 27.

Prof. Dr. H. Adlercreutz
Department of Clinical Chemistry, University of Helsinki
Meilahti Hospital
SF-00290 Helsinki 29
Finland